第 38 卷第 8 期 生 态 学 报 Vol.38,No.8
2018 年 4 月 ACTA ECOLOGICA SINICA Apr.,2018

DOI: 10.5846/stxb201704270772

孙翼飞,沈菊培,张翠景,韩国栋,红梅,赵巴音那木拉,贺纪正.不同放牧强度下土壤氨氧化和反硝化微生物的变化特征.生态学报,2018,38(8):2874-2883.

Sun Y F, Shen J P, Zhang C J, Han G D, Hong M, Zhao Bayinnamula, He J Z.Responses of soil ammonia oxidizers and denitrifiers to different grazing intensities.Acta Ecologica Sinica,2018,38(8):2874-2883.

不同放牧强度下土壤氨氧化和反硝化微生物的变化特征

孙翼飞[1,2],沈菊培[1,2,*],张翠景[1,2],韩国栋[3],红 梅[3],赵巴音那木拉[3],贺纪正[1,2]

1 中国科学院生态环境研究中心城市与区域生态国家重点实验室,北京 100085

2 中国科学院大学,北京 100049

3 内蒙古农业大学生态环境学院,呼和浩特 010019

摘要:土壤硝化及反硝化功能微生物在氮素可利用性、硝酸盐淋溶和氧化亚氮温室气体排放等方面起着关键作用,在指示不同放牧强度对生态系统的影响及预测草地生态系统退化状况等方面具有重要意义。以内蒙古干旱半干旱草原不同放牧强度(轻度、中度和重度)的长期试验样地为对象,应用定量 PCR 和限制性末端片段长度多态性(Terminal restriction fragment length polymorphism,T-RFLP)的方法,研究土壤氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)、氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)和反硝化细菌的丰度、群落结构和多样性对不同放牧强度的响应。结果表明,土壤 pH 和铵态氮含量分别在 7.90—8.18 和 6.37—35.92 mg/kg 之间,中度放牧处理显著增高了土壤 pH($P=0.03$),而铵态氮含量在重度放牧处理中最高($P=0.02$)。不同放牧强度下土壤异养呼吸相比未放牧处理均显著降低($P=0.02$)。土壤 AOA-*amoA* 和 AOB-*amoA* 基因丰度范围分别为每克干土$(4.94—7.60)\times 10^9$个拷贝数和$(0.68—3.75)\times 10^6$个拷贝数,放牧处理对 AOA-*amoA* 基因丰度无显著影响,中度放牧处理显著降低了 AOB-*amoA* 基因丰度($P=0.04$);反硝化微生物 *nosZ* 基因丰度随在轻度放牧处理中最低($P=0.03$)。土壤铵态氮含量是影响 AOA-*amoA* 和 AOB-*amoA* 基因丰度的主要因子,而 *nosZ* 基因丰度主要受反硝化底物含量及土壤通气状况的影响。冗余分析表明由放牧所引起的可利用性氮含量的变化是导致氨氧化和反硝化微生物群落结构显著变化的主要因素。

关键词:氨氧化古菌;氨氧化细菌;干旱半干旱草原;硝化潜势;反硝化酶活性;放牧

Responses of soil ammonia oxidizers and denitrifiers to different grazing intensities

SUN Yifei[1,2], SHEN Jupei[1,2,*], ZHANG Cuijing[1,2], HAN Guodong[3], HONG Mei[3], ZHAO Bayinnamula[3], HE Jizheng[1,2]

1 *State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100085, *China*

2 *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, *China*

3 *College of Ecology and Environmental Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot* 010019, *China*

Abstract: Soil nitrifiers and denitrifiers play key roles in determining soil nitrogen (N) availability, nitrate leaching, and N_2O emission, and thus they could be indicative to the effects of grazing intensity on grassland ecosystems as well as grassland degradation. In this study, soil samples were collected from a long-term field experiment with different grazing intensities (low-level, middle-level, and high-level grazing) in arid and semi-arid grasslands in Inner Mongolia. We

基金项目:国家重点基础研究发展规划“973”项目(2013CB956300); 国家自然科学基金项目(41371265)

收稿日期:2017-04-27; **网络出版日期**:2018-01-08

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: jpshen@ rcees.ac.cn

analyzed the responses of ammonia-oxidizing archaea (AOA), ammonia-oxidizing bacteria (AOB), and denitrifiers, in terms of abundance, community composition, and diversity, at different grazing intensities using real-time PCR and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) approaches. The results showed that soil pH and ammonium content ranged from 7.90—8.18 and 6.37—35.92 mg/kg, respectively. Middle-level grazing significantly increased soil pH ($P=0.03$), whereas soil ammonium content was recorded as the highest in the high-level grazing treatment ($P=0.02$). Soil heterotrophic respiration was markedly lower owing to the effects of grazing intensity than that in the non-grazing treatment ($P=0.02$). AOA-*amoA* and AOB-*amoA* gene abundances ranged from $(4.94—7.60)\times10^9$ and $(0.68—3.75)\times10^6$ copies/g dry soil, respectively. AOA-*amoA* gene abundance showed no significant change in any of the treatments, whereas middle-level grazing strongly decreased AOB-*amoA* gene abundance ($P=0.04$). The abundance of *nosZ* gene (coding for nitrous oxide reductase) was significantly decreased in the low-level grazing treatment ($P=0.03$). The abundances of AOA and AOB were significantly influenced by ammonium content, whereas *nosZ* gene abundance was influenced by substrate content and soil aeration. Redundancy analysis showed that the variation in N availability induced by grazing was the major factor influencing the community composition of ammonia oxidizers and denitrifiers.

Key Words: ammonia-oxidizing archaea; ammonia-oxidizing bacteria; arid and semi-arid grassland; potential nitrification rate; denitrifying enzyme activity; grazing

放牧是草地生态系统主要的土地利用方式之一,动物的采食、践踏和排泄等行为直接或间接的影响草地植物群落组成。有研究表明,放牧显著降低了植物地上生物量,进而影响植物对土壤氮素的吸收,降低生态系统生产力[1],且不同放牧强度下地上植物生产力及植物群落组成有显著变化[2]。植物是生态系统物质循环的纽带,地上植物生物量、丰度及多样性的变化势必会影响地下生态系统功能及元素循环过程[3-4]。因此,放牧会直接或间接的影响土壤微生物代谢、生长和养分转化等。Xie 和 Wittig 研究发现,随着放牧强度的增加,土壤有机质、有机氮含量显著降低[5]。轻度放牧会增加土壤总氮含量,促进土壤氮素循环,有利于提高土壤肥力,而重度放牧会降低土壤有效氮含量,从而影响植物氮吸收[6]。放牧对植物生产力、土壤环境及氮素循环的影响已有大量的研究[7-8],而参与氮循环的土壤微生物对放牧强度的响应机制还不十分明确[9]。

氨氧化作用是土壤硝化作用的限速步骤,是氮循环过程的关键环节[10];氨氧化过程的产物硝酸盐通过反硝化作用还原为一系列氮氧化气体和氮气,进而导致土壤氮素的损失及温室气体排放增加[11-12],加剧全球气候变化。土壤硝化及反硝化功能微生物在氮素可利用性、硝酸盐淋溶和氮氧化气体排放等方面起着关键作用。有研究表明,放牧显著降低了荒漠草原氨氧化及反硝化微生物功能基因丰度,进而显著影响土壤中可利用氮含量及生态系统氮素流失[11]。轻度放牧可显著刺激地下微生物活性,而中度和重度放牧通过改变土壤异养呼吸、矿化和硝化过程,进而影响土壤氮库[13-15]。理解放牧对微生物介导的氨氧化过程和反硝化过程的影响及其反馈有助于认识草地生态系统氮素循环过程及其对人类活动及气候变化的响应机制,为草地生态系统恢复及合理开发利用提供科学依据。

北方温带草原是我国重要的生态屏障,在涵养水源、防风固沙、调节气候、维持生物多样性和提供畜牧产品等方面发挥着不可替代的作用。近几十年来,我国草地不同程度地存在着过度放牧现象,草地退化严重。本研究依托于内蒙古农牧科学院四子王旗试验基地不同放牧强度的试验,分析放牧强度对土壤理化性质、氨氧化细菌(ammonia oxidizing bacteria, AOB)和氨氧化古菌(ammonia oxidizing archaea, AOA)微生物(*amoA* 基因)及反硝化(如 *nosZ* 基因)功能微生物丰度、群落结构及多样性的影响,以探索草地生态系统土壤微生物对放牧干扰的响应机制。

1　材料与方法

1.1　试验样地与设计

试验样地位于内蒙古农牧科学院四子王旗试验基地(41°47′17″ N,111°53′46″ E),年平均气温在 3.4 ℃,

年平均降水量在 110—250 mm 之间。试验区植被属短花针茅荒漠草原的地带性植被,草场处于半干旱草原和干旱半荒漠草原地带。草地植物群落类型为短花针茅+冷蒿+无芒隐子草[16]。

放牧试验开始于 2004 年,整个试验区分为 12 个小区,划分为 3 个区组,每个区组有对照区、轻度放牧区、中度放牧区和重度放牧区 4 种处理,每个处理 3 个重复。各小区位置完全随机分布,面积为 4.40 hm^2。放牧载蓄率分别为对照 0 只/hm^2、轻度放牧 0.93 只/hm^2、中度放牧 1.82 只/hm^2、重度放牧 2.71 只/hm^2[17]。供试羊为当地成年蒙古羯羊,每年总放牧期为 6 个月,放牧从 6 月初开始,到 11 月末结束。试验区绵羊每 3 年更换一次。

土壤采集于 2014 年 5 月底。每个小区以"S"形采集 9 个样点,每个采样点用直径 5 cm 的土钻取 0—20 cm 土壤,混合后作为该小区供试土样。剔除土壤中可见的石块和动植物残体后,土样带回实验室过 2 mm 筛后一部分保存于-80 ℃超低温冰箱,用于分子生物学分析;另一部分土样自然风干,用于测定土壤基本化学性质。

1.2 土壤基本理化性质和微生物活性测定

新鲜土样在 105 ℃烘箱中烘干 12 h 测定土壤含水量。采用 pH 计以土水比 1:2.5(g/mL)测定土壤 pH (Delta 320, Mettler-Toledo Instruments Co., Shanghai, China)。采用常规重铬酸钾容量法-外加热法,测定土壤有机碳含量。土壤铵态氮(NH_4^+-N)和硝态氮(NO_3^--N)用 1 mol/L 氯化钾提取(土水比 1:5,g/mL),使用连续流动分析仪(SAN++, Skalar, Holland)测定浓度。

硝化潜势及反硝化酶活性的测定分别采用氯酸盐抑制法[11]和乙炔抑制法[12],主要步骤同文献[18]。土壤异养呼吸是指微生物分解土壤有机质后释放 CO_2 的过程,其测定方法如下:称量 10 g 新鲜土壤加入到 120 mL 血清瓶中,在 25 ℃条件下培养 24 h, 用气相色谱仪(Agilent 7890A GC System)测定产生的 CO_2 浓度[19]。

1.3 土壤 DNA 提取和实时定量 PCR

称取 0.25 g 冻干土,按照 PowerSoil™ Total DNA Isolation 试剂盒(Mo Bio Laboratories, Inc., San Diego, CA, USA)所提供的方法提取土壤 DNA。采用 NanoDrop 分光光度计(NanoDrop Technologies, USA)测定 DNA 的浓度和纯度。DNA 样品存储在-20 ℃,10 倍稀释后用作下游分子实验的模板。

AOA-*amoA*、AOB-*amoA* 和 *nosZ* 基因的定量测定在 iCycler iQ5 仪器(Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)上完成,使用的引物和扩增条件如表 1 所示。采用 SYBR GREEN 作为荧光标记,反应体系为 25 μL,包含 12.5 μL 2 x SYBR Premix Ex Taq™(Takara Biotechnology, Japan),前后引物各 0.5 μL(10 μmol/L),2 μL 的 DNA 模板 (1—10 ng),其余用灭菌水补足。用于标准曲线的质粒制备和提取参照之前文献中发表的方法[23],十倍连续稀释的质粒用于构建定量 PCR 的标准曲线,所有基因的扩增效率均保证在 85%—98%之间,R^2 为 0.99。利用溶解曲线和琼脂糖凝胶电泳确保扩增的特异性。

1.4 末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)

采用末端限制性片段长度多态性(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)方法来评估放牧强度对 AOA-*amoA*,AOB-*amoA* 和 *nosZ* 基因群落结构的影响。其原理是用荧光标记目标 DNA 片段的末端(5′端),酶切后产生长度不等的末端限制性长度片段(T-RFs),经测序后输出带有 T-RFs 长度大小及荧光强度的图谱,图谱含有的波峰越多,表明微生物种类越丰富[24]。通过对不同样品图谱间波峰的比较,可得到各功能基因群落结构和多样性在处理间的差异。土壤 DNA 的 PCR 扩增采用表 1 所列引物,其中正向引物的 5′末端用 6-carboxyfluorescein(FAM)标记荧光用于 T-RFLP 研究。PCR 产物用 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 试剂盒(Promega, USA)纯化。选取适当的限制性内切酶酶切纯化后的产物,即 AOA-*amoA* 和 *nosZ* 基因采用的内切酶是 *Hha* I(TaKaRa Biotechnology, Japan),AOB-*amoA* 基因采用内切酶 *Msp* I(Takara Biotechnology, Japan)。反应体系为 20 μL,包括酶(4 U)和 DNA 样品(约 500 ng),在 37 ℃下酶切 3 h。反应产物送至测序公司(TSINGKE, Beijing),利用 ABI PRISM 3700 DNA 分析仪(Applied Biosystems, USA)进行毛细管电泳,检测酶切片段。使用 GeneMarker 软件(SoftGenetics, USA)分析得到的图谱,合并长度相差 1 bp 的

片段。T-RFs 的相对丰度用每个片段的峰面积除以总的峰面积表示,相对丰度不到 1%的片段未参与计算。

表 1　PCR 所用的引物序列和反应条件

Table 1　Primer sequences and reaction conditions used for PCR

基因名称 Target genes	引物 Primers	序列 (5′-3′) Sequences (5′-3′)	反应条件 Thermal conditions
AOA-*amoA*	CrenamoA23f	ATGGTCTGGCTWAGACG	qPCR: 95 ℃ 1 min; 35 cycles of 95 ℃/30 s; 55 ℃/30 s, 72 ℃/30 s
	CrenamoA616r[20]	GCCATCCATCTGTATGTCCA	T-RFLP: 94 ℃/5 min; 10 cycles of 94 ℃/30 s, 60 ℃/30 s (-0.5 ℃/cycle), 72 ℃/30 s; 25 cycles of 94 ℃/30 s, 55 ℃/45 s, 72 ℃/1 min, 72 ℃/5 min
AOB-*amoA*	*amoA*-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	qPCR: 95 ℃/1 min, 35 cycles of 95 ℃/30 s, 60 ℃/30 s, 72 ℃/30 s
	amoA-2R[21]	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	T-RFLP: 94 ℃/5 min; 10 cycles of 94 ℃/30 s, 62 ℃/45 s(-0.5 ℃/cycle), 72 ℃/1 min; 25 cycles of 94 ℃/30 s, 57 ℃/45 s, 72 ℃/1 min, 72 ℃/5 min
nosZ	*nosZ*2F	CGCRACGGCAASAAGGTSMSSGT	qPCR: 95 ℃/1 min; 6 cycles of 95 ℃/30 s, 63 ℃/30 s (-1 ℃/cycle), 72 ℃/30 s; 30 cycles of 95 ℃/30 s, 60 ℃/30 s, 72 ℃/30 s
	*nosZ*2R	CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA	
	nosZ-F[22]	CGYTGTTCMTCGACAGCCAG	T-RFLP: 95 ℃/5 min; 30 cycles of 95 ℃/30 s, 60 ℃/30 s, 72 ℃/30 s, 72 ℃/5 min

(*nosZ*-F+*nosZ*2R) 用于 *nosZ* 基因的 T-RFLP 分析

1.5　统计分析

统计分析采用 R 3.3.2 及 SPSS 19 软件进行,当 $P < 0.05$ 时,差异显著。单因素方差分析(Duncan 检验)用来检验试验处理间的差异显著性。以不同 T-RFs 的相对丰度构建 Bray-Curtis 矩阵,应用排列多元方差分析(PerMANOVA)评估不同放牧强度对土壤微生物群落结构及多样性的影响,以香农指数(Shannon index)表征微生物群落的多样性。Spearman 相关分析用来评估土壤理化性质(即 pH、SM、NH_4^+-N、NO_3^--N、SOC)、微生物活性与土壤功能微生物丰度及群落多样性的相关性。冗余分析(Redundancy analysis, RDA)用来揭示土壤理化性质对微生物群落结构的影响。

2　结果与分析

2.1　不同放牧强度对土壤理化性质和微生物活性的影响

不同放牧强度对土壤理化性质和微生物活性的影响见表 2。随放牧强度的增加,土壤 pH 波动范围为 7.90—8.18,在中度放牧处理中显著增加($P=0.03$)。放牧处理显著增加了土壤铵态氮含量($P=0.02$),其含量变化范围为 6.37—35.92 mg/kg,且在重度放牧处理中最高。不同放牧强度土壤异养呼吸相比未放牧处理均显著降低($P=0.02$),波动范围为 1.54—4.70 μL CO_2 g^{-1} d^{-1}。随放牧强度增加,土壤含水量、有机碳、硝态氮、硝化潜势和反硝化酶活性无显著影响。Spearman 相关分析发现,土壤 pH 与土壤呼吸显著负相关($\rho=-0.66$, $P=0.02$)。

2.2　不同放牧强度对氨氧化和反硝化功能基因丰度的影响

应用定量 PCR 技术测定土壤氨氧化菌 AOA-*amoA*、AOB-*amoA* 基因及反硝化细菌 *nosZ* 基因的丰度(图 1)。不同放牧强度下 AOA-*amoA* 基因丰度无显著差异($P=0.26$),基因丰度范围为每克干土(4.94—7.60)×10^9个拷贝数。放牧强度对 AOB-*amoA*($P=0.04$)和 *nosZ*($P=0.03$)基因丰度有显著影响。AOB-*amoA* 基因丰度波动范围为每克干土(0.68—3.75)×10^6个拷贝数,且在中度放牧处理中最低,与未放牧处理相比降低了 18.1%。*nosZ* 基因丰度范围为每克干土(2.49—5.78)×10^8个拷贝数,且在轻度放牧处理中最低,与未放牧处理相比降低了 57.6%。

表 2 不同放牧强度下土壤理化性质与微生物活性

Table 2 Soil properties and microbial activities across different gazing intensities

处理 Treatment	对照 Control	轻度放牧 Low-level grazing	中度放牧 Middle-level grazing	重度放牧 High-level grazing
土壤含水量 Water content/%	3.50±0.33a	3.84±0.61a	3.37±0.19a	3.13±0.44a
土壤 pH Soil pH/(H_2O)	7.90±0.25b	8.16±0.04ab	8.18±0.11a	8.12±0.07ab
有机碳 Soil organic carbon/(g/kg)	29.36±1.81a	29.14±1.05a	29.07±3.35a	26.83±2.22a
铵态氮含量 Ammonia content/(mg/kg)	6.37±1.81b	8.15±1.38b	15.33±1.87b	35.92±18.62a
硝态氮含量 Nitrate content/(mg/kg)	7.04±4.68a	3.85±0.73a	7.59±2.16a	4.93±2.21a
硝化潜势 Potential nitrification rate/(mg NO_2^--N kg^{-1} h^{-1})	1.85±0.13a	1.71±0.19a	1.51±0.31a	1.85±0.15a
反硝化酶活 Denitrifying enzyme activity/(μg N_2O kg^{-1} h^{-1})	0.13±0.02a	0.09±0.07a	0.02±0.001a	0.05±0.003a
土壤异养呼吸 Soil heterotrophic respiration/(μL CO_2 g^{-1} d^{-1})	4.70±2.12a	1.54±0.16b	1.56±0.40b	1.63±0.31b

同一行数据后不同字母表示同一测量指标在不同处理间差异显著(Duncan 检验),显著性水平 $P < 0.05$;表中数据为平均值±标准差($n=3$)

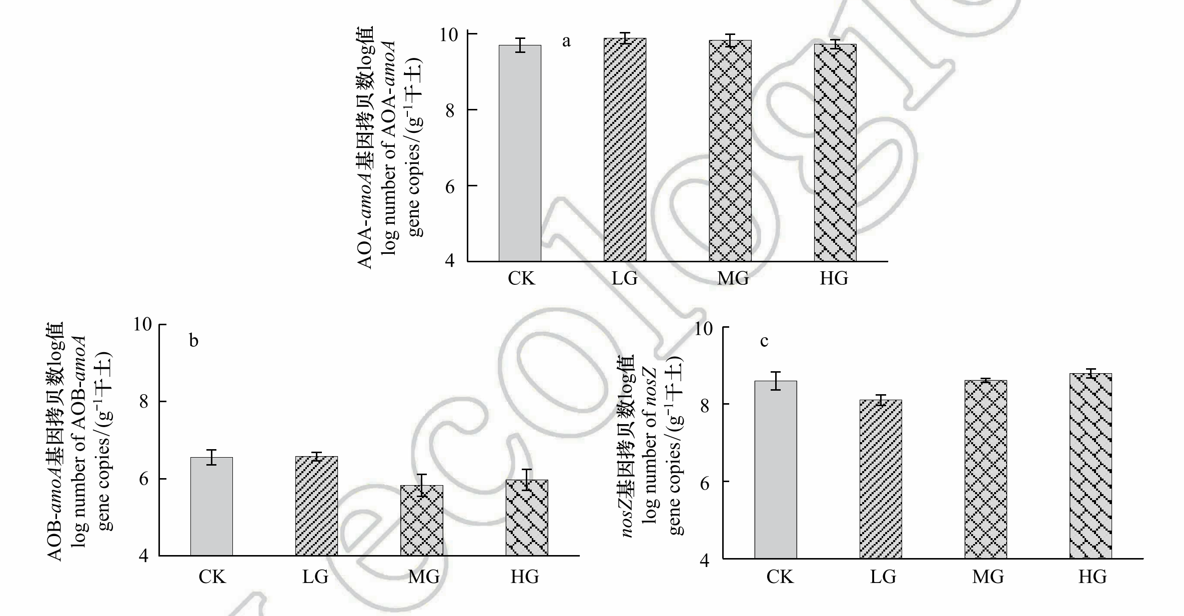


图 1 不同放牧强度下土壤 AOA-*amoA*(a)、AOB-*amoA*(b)和 *nosZ*(c)基因的丰度

Fig.1 Abundance of AOA-*amoA* gene (a), AOB-*amoA* gene (b) and *nosZ* gene (c) across different grazing intensities

CK:对照,control;LG:轻度放牧,low-level grazing;MG:中度放牧,middle-level grazing;HG:重度放牧,high-level grazing

Spearman 相关分析表明,AOA-*amoA* 基因丰度与土壤异养呼吸(Rh)显著负相关($\rho=-0.69, P=0.01$),AOB-*amoA* 基因丰度与铵态氮含量显著负相关($\rho=-0.60, P=0.04$)。*nosZ* 基因丰度与铵态氮含量显著正相关($\rho=0.58, P=0.04$),与土壤含水量($\rho=-0.78, P < 0.01$)显著负相关。

2.3 不同放牧强度对氨氧化和反硝化群落结构的影响

不同放牧强度下 AOA-*amoA*、AOB-*amoA* 和 *nosZ* 基因 T-RFLP 分析结果见图 2。使用 *Hha* I 酶对土壤 AOA-*amoA* 基因进行酶切,主要得到 5 个限制性末端片段(T-RFs),其中 T-RFs 541 bp、265 bp 和 352 bp 为优势片段,其平均相对丰度分别为 59.5%、21.4%和 9.3%。AOB-*amoA* 基因获得 6 个主要 T-RFs 片段,其中 T-RFs 70 bp、130 bp、154 bp 和 141 bp 是主要的片段,其平均相对丰度分别为 25.3%、24.7%、22.2%和 20.7%。反硝化 *nosZ* 基因主要获得 6 个片段,其中 T-RFs 109 bp、190 bp、75 bp 和 204 bp 为优势片段,其平均相对丰度分别为 40.7%、18.2%、12.3%和 10.8%。

以各功能基因 T-RFs 的相对丰度为依据,以香农指数(Shannon Index)表征 AOA-*amoA*、AOB-*amoA* 和 *nosZ*

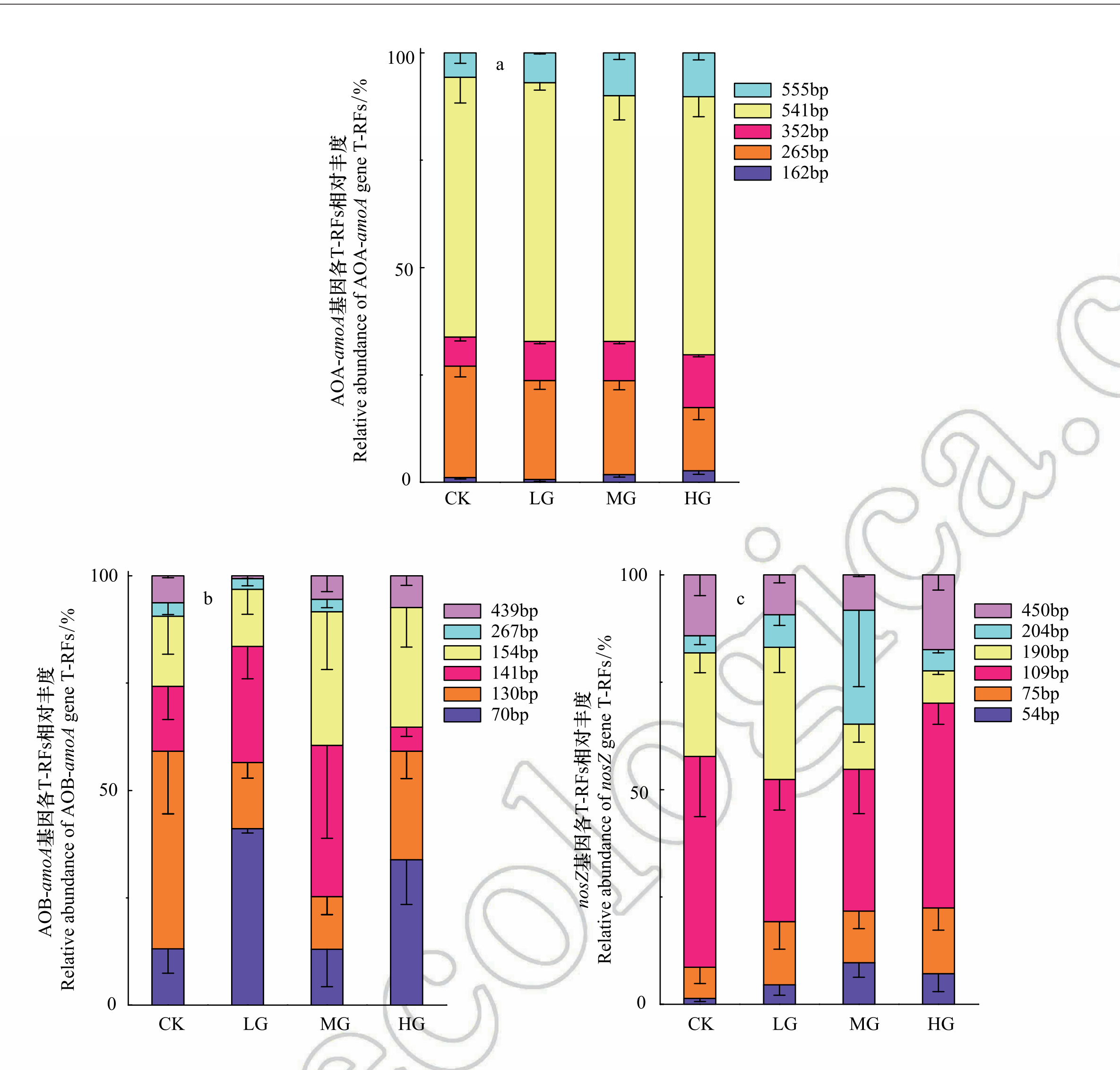


图 2　不同放牧强度下土壤 AOA-*amoA*（a）、AOB-*amoA*（b）和 *nosZ*（c）基因 T-RFs 相对丰度

Fig.2　Relative abundance of T-RFs of AOA-*amoA* gene（a）, AOB-*amoA* gene（b）and *nosZ* gene（c）across different grazing intensities

基因群落多样性。PerMANOVA 结果表明,随放牧强度的增加,AOA-*amoA*、AOB-*amoA* 和 *nosZ* 基因群落多样性均呈显著下降趋势,且中度和重度放牧处理显著低于轻度放牧处理(表 3)。Spearman 相关分析结果表明,AOB-*amoA* 和 *nosZ* 基因群落多样性与 Rh 显著正相关($\rho=0.52$,$P=0.02$;$\rho=0.55$,$P < 0.05$),AOA-*amoA* 基因群落多样性与 SOC 显著正相关($\rho=0.44$,$P < 0.05$)。

表 3　不同放牧强度下 AOA-*amoA*、AOB-*amoA* 和 *nosZ* 基因香农指数

Table 3　The Shannon index of AOA-*amoA*, AOB-*amoA* and *nosZ* gene in different grazing intensities

处理 Treatment	AOA-*amoA*	AOB-*amoA*	*nosZ*
对照 Control	10.46±0.07a	10.70±0.12a	10.78±0.03a
轻度放牧 Low-level grazing	10.07±0.19a	10.17±0.24a	10.26±0.17a
中度放牧 Middle-level grazing	9.04±0.12b	9.36±0.49b	9.28±0.20b
重度放牧 High-level grazing	8.71±0.13b	8.93±0.19b	9.00±0.13b

不同小写字母表示同一测量指标在不同处理间差异显著(Duncan 检验),显著性水平 $P<0.05$;表中数据为平均值±标准差($n=3$)

不同放牧强度对 AOA-*amoA* 基因群落结构有显著影响($P=0.04$),而对 AOB-*amoA* 和 *nosZ* 基因群落结构无显著性影响。应用冗余分析(RDA)来评估微生物群落结构和土壤理化性质之间的关系(图 3)。结果表明:前两轴对 AOA-*amoA* 基因群落的解释量分别为 40.1%和 10.4%,且土壤 SOC（$P=0.03$）、铵态氮($P=0.02$)

及硝态氮($P=0.02$)含量对 AOA-*amoA* 基因群落结构有显著影响。前两轴共同解释了 AOB-*amoA* 基因群落结构变异程度的 45.7%,土壤 pH($P=0.08$)是显著影响 AOB-*amoA* 基因群落变化的环境因子。前两轴对 *nosZ* 基因群落结构变异的解释度为 35.3%,且群落结构变化与硝态氮含量($P < 0.05$)显著相关。

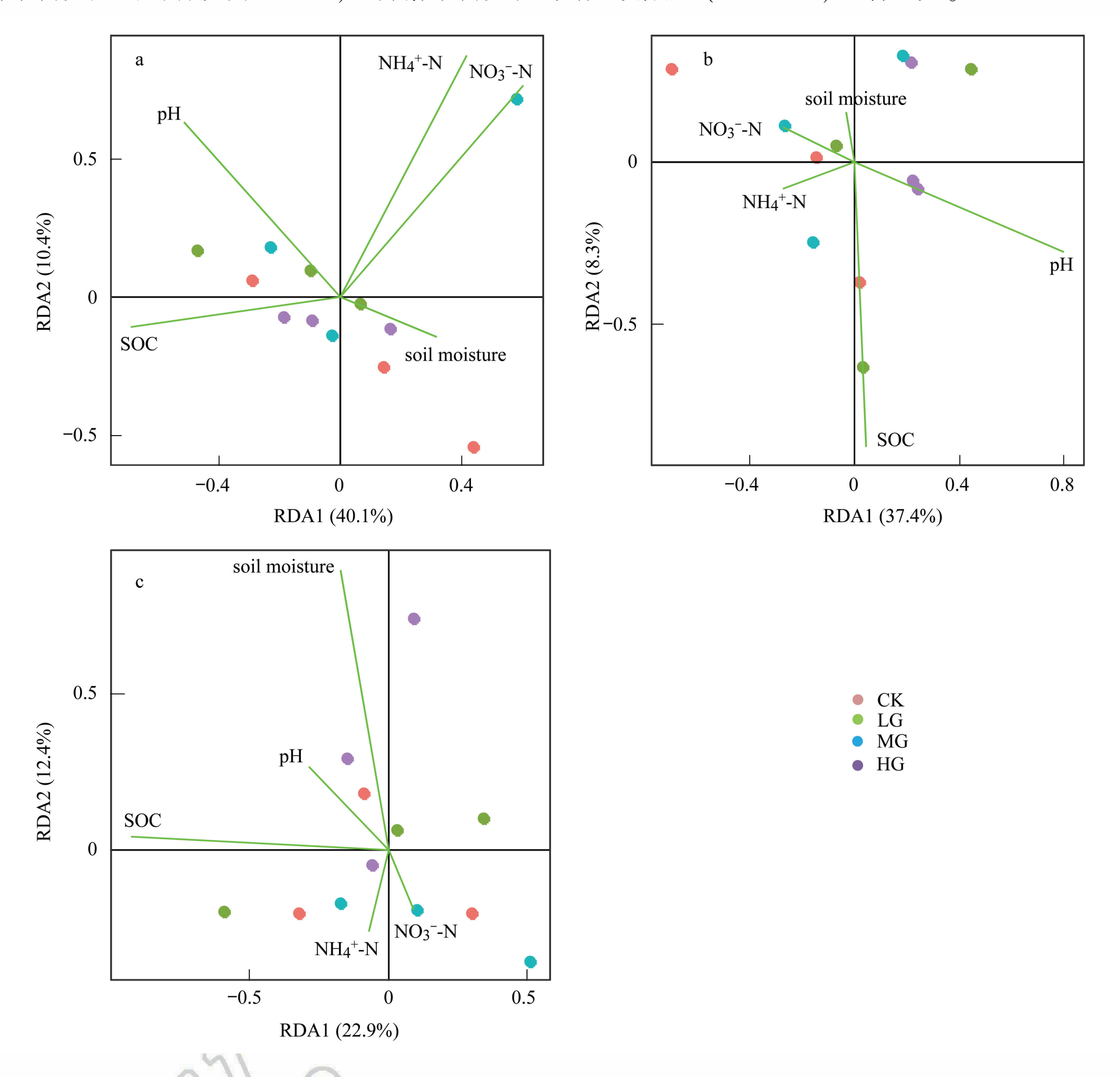


图 3 土壤 AOA-*amoA*(a)、AOB-*amoA*(b)和 *nosZ*(c)基因群落组成和环境变量的冗余分析

Fig.3 Biplot of redundancy analysis (RDA) of relationship between soil properties and communities of AOA-*amoA* gene (a), AOB-*amoA* (b) and *nosZ* gene (c)

pH:土壤 pH,potential of hydrogen;soil moisture:土壤含水量,soil moisture;SOC:土壤有机碳,soil organic carbon;NH_4^+-N:铵态氮含量,ammonia content;NO_3^--N:硝态氮含量,nitrate content

3 讨论

3.1 不同放牧强度对土壤理化性质和微生物活性的影响

放牧对土壤理化性质的影响随着放牧强度的不同而变化。本研究中土壤 pH 随放牧强度呈现先增加后降低的趋势,与未放牧处理相比,尽管中度放牧显著增加了土壤 pH($P=0.03$),但二者仅相差 0.2 个单位。有研究表明,放牧会显著增加土壤 pH[25-26],但本研究中土壤 pH 变化幅度较小,不足以作为评估放牧强度对土壤功能微生物影响的主要指标。放牧显著增加了土壤铵态氮的含量,这与其他学者的研究相一致[27-28]。随放牧强度的增加,进入土壤中的牲畜排泄物增加,进而增加土壤的铵态氮和硝态氮含量。土壤异养呼吸是土壤微生物活性的重要指标,反映了微生物对土壤有机质分解的速度和强度。本研究中放牧强度显著降低了土

壤异养呼吸。米智勇在研究不同放牧强度对该试验样地土壤理化性质的影响时发现,随放牧强度的增加,土壤碳氮比显著下降,其波动范围为 9.56—10.26,波动幅度为 0.67[29],说明微生物碳源含量的降低是土壤异氧呼吸显著降低的原因之一。

3.2　不同放牧强度对土壤氨氧化和反硝化微生物的影响

氨氧化和反硝化微生物是土壤中重要的氮素转化功能微生物,是土壤氨氧化和反硝化过程的主要参与者,其数量和活性与土壤生态系统氮循环密切相关。有研究表明,放牧会显著增加 AOA-*amoA* 和 AOB-*amoA* 基因丰度[30]。但本研究中,随放牧强度的增加,AOA-*amoA* 基因丰度无显著变化,AOB-*amoA* 基因丰度显著下降。造成这一结果的原因可能是:1)不同放牧处理显著影响了土壤 pH,但其值变异很小,始终在 pH 为 8 的范围波动,而土壤 AOA 的基因丰度无显著变化,这和我们前期的研究结果一致[31],即 AOA 尽管在土壤中保持很高的水平,但在碱性土壤中对氮的响应比 AOB 更为不灵敏;2)有学者认为,氨氧化功能微生物丰度更易受土壤理化性质的影响,而非放牧处理的影响[32],土壤可利用性底物含量是影响土壤氨氧化微生物的重要因素[33]。随着放牧强度增加,土壤铵态氮含量也显著增加,而硝态氮在不同处理间无显著差异,可能是采样时间离放牧处理的时间较近,由于放牧强度增大致使铵态氮大量累积;而氨氧化微生物主要以土壤中 NH_3 为底物[34],重度放牧处理后短时间内土壤可利用的 NH_3 含量有限,进而显著影响 AOB 的数量和群落多样性,而随着时间的推移,AOB 微生物可利用的底物也会逐渐增加,达到一个稳定的状态。此外,放牧强度对 AOA 基因群落结构有显著影响,AOB 基因群落结构无显著变化。RDA 结果显示土壤铵态氮和硝态氮含量对 AOA 群落具有显著影响,说明由放牧所导致的以牲畜排泄物形式进入土壤中的可利用氮含量增加是导致 AOA 群落结构变化的主要原因之一。

本研究中 *nosZ* 基因丰度与土壤铵态氮含量显著正相关。有研究表明,*nosZ* 基因参与了反硝化作用的最后一步,其丰度主要受底物含量、土壤通气状况及土壤 pH 等环境条件的影响[35]。放牧显著降低了 AOB 基因丰度,即降低了反硝化底物硝态氮的含量,且硝态氮含量在轻度放牧处理中最低,进而轻度放牧处理显著降低了 *nosZ* 基因丰度,但随放牧强度的增加,土壤紧实度增加,通气性降低,促进反硝化细菌的生长,进而增加了 *nosZ* 基因丰度。有研究指出 *nosZ* 基因丰度随放牧强度的增加无显著变化[36],这主要与研究区域的地理位置、植物群落、土壤类型等因素有关[37],同时,目前关于放牧强度界定(轻度、中度和重度)的差异也是造成上述结果不一致性的重要原因。此外,RDA 结果表明土壤硝态氮含量对 *nosZ* 基因群落结构有显著影响,说明随着放牧强度的增加,由牲畜采食践踏所导致的土壤有机质矿化加剧,显著影响土壤中可利用氮含量,进而影响土壤 *nosZ* 基因群落结构[38-39]。

4　结论

(1)土壤 pH 和铵态氮含量分别在 7.90—8.18 和 6.37—35.92 mg/kg 之间,中度放牧处理显著增加了土壤 pH(P=0.03),而铵态氮含量在重度放牧处理中最高(P=0.02)。不同放牧强度下土壤异养呼吸相比未放牧处理均显著降低(P=0.02)。

(2)AOA-*amoA* 和 AOB-*amoA* 基因丰度范围分别为每克干土(4.94—7.60)×10^9个拷贝数和(0.68—3.75)×10^6个拷贝数,放牧处理对 AOA-*amoA* 基因丰度无显著影响,中度放牧处理显著降低了 AOB-*amoA* 基因丰度(P=0.04);反硝化微生物 *nosZ* 基因丰度范围为每克干土(2.49—5.78)×10^8个拷贝数,且在轻度放牧处理中最低(P=0.03)。土壤铵态氮含量是影响 AOA 和 AOB 功能基因 *amoA* 丰度的主要因子,而 *nosZ* 基因丰度主要受反硝化底物含量及土壤通气状况影响。

(3)放牧显著影响了 AOA-*amoA* 基因群落结构,而 AOA-*amoA*、AOB-*amoA* 和 *nosZ* 基因群落多样性均随放牧强度的增加而降低,且中度和重度放牧显著低于轻度放牧。由放牧所引起的可利用氮素含量的变化是导致氨氧化和反硝化微生物群落显著变化的主要因素。

参考文献(References):

[1] 安慧, 李国旗. 放牧对荒漠草原植物生物量及土壤养分的影响. 植物营养与肥料学报, 2013, 19(3): 705-712.

[2] 陈佐忠, 汪诗平. 中国典型草原生态系统. 北京: 科学出版社, 2000: 1-5.

[3] 高英志, 汪诗平, 韩兴国, 陈全胜, 王艳芬, 周志勇, 张淑敏, 杨晶. 退化草地恢复过程中土壤氮素状况以及与植被地上绿色生物量形成关系的研究. 植物生态学报, 2004, 28(3): 285-293.

[4] 沙琼, 黄建辉, 白永飞, 韩兴国. 植物功能群去除对内蒙古典型草原羊草群落土壤碳、氮库的影响. 应用生态学报, 2009, 20(6): 1305-1309.

[5] Xie Y Z, Wittig R. The impact of grazing intensity on soil characteristics of *Stipa grandis* and *Stipa bungeana* steppe in northern China (autonomous region of Ningxia). Acta Oecologica, 2004, 25(3): 197-204.

[6] 高雪峰, 韩国栋. 放牧对羊草草原土壤氮素循环的影响. 土壤, 2011, 43(2): 161-166.

[7] Guitian R, Bardgett R D. Plant and soil microbial responses to defoliation in temperate semi-natural grassland. Plant and Soil, 2000, 220(1/2): 271-277.

[8] Clegg C D. Impact of cattle grazing and inorganic fertiliser additions to managed grasslands on the microbial community composition of soils. Applied Soil Ecology, 2006, 31(1/2): 73-82.

[9] Zhou X Q, Wang J Z, Hao Y B, Wang Y F. Intermediate grazing intensities by sheep increase soil bacterial diversities in an Inner Mongolian steppe. Biology and Fertility of Soils, 2010, 46(8): 817-824.

[10] Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol G W, Prosser J I, Schuster S C, Schleper C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. Nature, 2006, 442(7104): 806-809.

[11] Chen Y L, Hu H W, Han H Y, Du Y, Wan S Q, Xu Z W, Chen B D. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing *Archaea* and *Bacteria* in response to fertilization and mowing in a temperate steppe in Inner Mongolia. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 89(1): 67-79.

[12] Tiedje J M, Simkins S, Groffman P M. Perspectives on measurement of denitrification in the field including recommended protocols for acetylene based methods. Plant and Soil, 1989, 115(2): 261-284.

[13] Liu N, Zhang Y J, Chang S J, Kan H M, Lin L J. Impact of grazing on soil carbon and microbial biomass in typical steppe and desert steppe of Inner Mongolia. PLoS One, 2012, 7(5): e36434.

[14] Gao Y H, Schumann M, Chen H, Wu N, Luo P. Impacts of grazing intensity on soil carbon and nitrogen in an alpine meadow on the eastern Tibetan Plateau. Journal of Food, Agriculture and Environment, 2009, 7(2): 749-754.

[15] Xu Y Q, Li L H, Wang Q B, Chen Q S, Cheng W X. The pattern between nitrogen mineralization and grazing intensities in an Inner Mongolian typical steppe. Plant and Soil, 2007, 300(1/2): 289-300.

[16] 孙熙麟, 王明玖, 陈海军, 陈丽丽, 娜乐. 短花针茅荒漠草原地下生物量对不同强度放牧的响应. 内蒙古农业大学学报, 2010, 31(4): 101-104.

[17] 胡红莲. 不同放牧时期放牧绵羊营养限制因素及冬季优化补饲的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2005.

[18] Zhang C J, Shen J P, Sun Y F, Wang J T, Zhang L M, Yang Z L, Han H Y, Wan S Q, He J Z. Interactive effects of multiple climate change factors on ammonia oxidizers and denitrifiers in a temperate steppe. FEMS Microbiology Ecology, 2017, 93(4): fix037.

[19] Chen C R, Condron L M, Davis M R, Sherlock R R. Effects of afforestation on phosphorus dynamics and biological properties in a New Zealand grassland soil. Plant and Soil, 2000, 220(1/2): 151-163.

[20] Tourna M, Freitag T E, Nicol G W, Prosser J I. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. Environmental Microbiology, 2008, 10(5): 1357-1364.

[21] Rotthauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(12): 4704-4712.

[22] Scala D J, Kerkhof L J. Horizontal heterogeneity of denitrifying bacterial communities in marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 1980-1986.

[23] Wang Q, Zhang L M, Shen J P, Du S, Han L L, He J Z. Nitrogen fertiliser-induced changes in N_2O emissions are attributed more to ammonia-oxidising bacteria rather than archaea as revealed using 1-octyne and acetylene inhibitors in two arable soils. Biology and Fertility of Soils, 2016, 52(8): 1163-1171.

[24] Osborn A M, Moore E R B, Timmis K N. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. Environmental Microbiology, 2000, 2(1): 39-50.

[25] 戎郁萍, 韩建国, 王培, 毛培胜. 放牧强度对草地土壤理化性质的影响. 中国草地, 2001, 23(4): 41-47.

[26] 陈海军, 王明玖, 韩国栋, 吴志毅. 不同强度放牧对贝加尔针茅草原土壤微生物和土壤呼吸的影响. 干旱区资源与环境, 2008, 22(4): 165-169.

[27] 萨仁高娃, 曹芙, 敖特根, 叁巴, 王成杰. 短期放牧强度对典型草原土壤有机碳及 pH 值的影响. 畜牧与饲料科学, 2014, 35(3): 5-7.

[28] 杨红善, 那·巴特尔, 周学辉, 苗小林, 苏晓春, 常根柱. 不同放牧强度对肃北高寒草原土壤肥力的影响. 水土保持学报, 2009, 23(1): 150-153.

[29] 米智勇. 不同放牧强度和管理方式下短花针茅荒漠草原土壤的氮矿化作用[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2011.

[30] Xie Z, Le Roux X, Wang C P, Gu Z K, An M, Nan H Y, Chen B Z, Li F, Liu Y J, Du G Z, Feng H Y, Ma X J. Identifying response groups of soil nitrifiers and denitrifiers to grazing and associated soil environmental drivers in Tibetan alpine meadows. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 77: 89-99.

[31] Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G, Zhang J B, He J Z. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. Environmental Microbiology, 2008, 10(6): 1601-1611.

[32] Lindsay E A, Colloff M J, Gibb N L, Wakelin S A. The abundance of microbial functional genes in grassy woodlands is influenced more by soil nutrient enrichment than by recent weed invasion or livestock exclusion. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(16): 5547-5555.

[33] 王静, 尉元明, 孙旭映. 过牧对草地生态系统服务价值的影响——以甘肃省玛曲县为例. 自然资源学报, 2006, 21(1): 109-117.

[34] He J Z, Hu H W, Zhang L M. Current insights into the autotrophic thaumarchaeal ammonia oxidation in acidic soils. Soil Biology and Biochemistry, 2012, 55: 146-154.

[35] Liu B B, Mørkved P T, Frostegård Å, Bakken L R. Denitrification gene pools, transcription and kinetics of NO, N_2O and N_2 production as affected by soil pH. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 72(3): 407-417.

[36] Patra A K, Abbadie L, Clays-Josserand A, Degrange V, Grayston S J, Loiseau P, Louault F, Mahmood S, Nazaret S, Philippot L, Poly F, Prosser J I, Richaume A, Le Roux X. Effects of grazing on microbial functional groups involved in soil N dynamics. Ecological Monographs, 2005, 75(1): 65-80.

[37] Ding K, Zhong L, Xin X P, Xu Z H, Kang X M, Liu W J, Rui Y C, Jiang L L, Tang L, Wang Y F. Effect of grazing on the abundance of functional genes associated with N cycling in three types of grassland in Inner Mongolia. Journal of Soils and Sediments, 2015, 15(3): 683-693.

[38] He F F, Jiang R F, Chen Q, Zhang F S, Su F. Nitrous oxide emissions from an intensively managed greenhouse vegetable cropping system in northern China. Environmental Pollution, 2009, 157(5): 1666-1672.

[39] Sánchez-Martín L, Vallejo A, Dick J, Skiba U M. The influence of soluble carbon and fertilizer nitrogen on nitric oxide and nitrous oxide emissions from two contrasting agricultural soils. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40: 142-151.